

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局



(43) 国际公布日:  
2004年1月8日(08.01.2004)

PCT

(10) 国际公布号:  
WO 04/003007 A1

(51) 国际分类号: C07K 7/06, A61K 38/08, A61P 19/02, 37/06

(21) 国际申请号: PCT/CN03/00496

(22) 国际申请日: 2003年6月26日(26.06.2003)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:  
02123412.4 2002年6月27日(27.06.2002) CN

(71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 北京大学人民医院(PEOPLE'S HOSPITAL, PEKING UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国北京市西城区西直门南大街11号, Beijing 100044 (CN)。

(72) 发明人;及

(75) 发明人/申请人(仅对美国): 栗占国(Li, Zhanguo) [CN/CN]; 中国北京市西城区西直门南大街11号, Beijing 100044 (CN)。

(74) 代理人: 北京市中咨律师事务所(ZHONGZI LAW OFFICE); 中国北京市海淀区三里河路甲11号中国建材大厦C座5层, Beijing 100037 (CN)。

(81) 指定国(国家): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

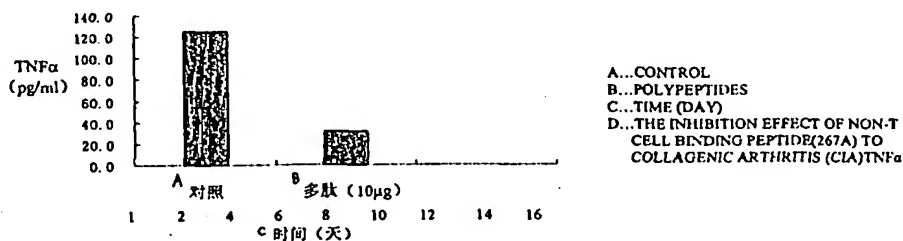
(84) 指定国(地区): ARIPO专利(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI专利(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

本国际公布:  
— 包括国际检索报告。

所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: NON-T CELL BINDING PEPTIDES AND THEIR USES

(54) 发明名称: 非T细胞结合肽及其用途



D 非T细胞结合肽(267A) 对胶原性关节炎 (CIA) TNFα产生的抑制作用

(57) Abstract: The invention provides a non-T cell binding peptides and their analogs used for treatment of rheumatoid arthritis. The polypeptides therapeutic agent can specifically inhibit abnormal immunoreaction of the rheumatoid arthritis, and fundamentally control the progression of this disease aimed at the initiating factor of the disease development.

[见续页]

BEST AVAILABLE COPY

WO 04/003007 A1



---

(57) 摘要

本发明提供一种非 T 细胞结合肽及其类似物用于类风湿关节炎的治疗。这种多肽治疗剂可特异性抑制类风湿关节炎的异常免疫反应，针对发病的起始环节，从根本上控制本病的发展。

## 非 T 细胞结合肽及其用途

本发明涉非 T 细胞结合肽的制备及其作为治疗类风湿关节炎和其它自身免疫病的药物的应用。

### 一、背景技术

类风湿关节炎(RA)是一种常见的以关节病变为主的慢性致残性自身免疫病。在中国的患病率为 0.34%，全国有近 500 万患者，致残率高达 93%。该病的发病过程是一种受抗原驱动的“激发—连锁免疫反应”的过程。感染因子及自身免疫反应介导的免疫损伤是类风湿关节炎发病及病情演变的基础。抗原多肽通过体内的抗原提呈细胞表达，并激活 T 淋巴细胞，导致细胞因子的释放、免疫球蛋白、趋化因子及自由基等炎性介质产生增多，进而引起血管炎，滑膜增生，软骨及骨破坏等类风湿关节炎的特征性病理变化。

目前，尚无从根本上控制类风湿关节炎的药物。临床上主要通过非甾体抗炎药如布洛芬及双氯芬酸等消炎止痛药暂时缓解症状。而慢作用抗风湿药如甲氨喋呤及来氟米特等则是通过抑制 DNA 合成广泛抑制免疫反应，进而抑制关节炎症。因此，这些药物在类风湿关节炎治疗中并非作用于发病的最初环节，难以针对性的控制病变，致使全身及关节病变不断进展，最终致残。而且，由于这些药物的广泛免疫抑制作用，骨髓抑制，肝功能异常等不良反应较多，致使很多患者不能接受这些药物治疗。

目前急需能够针对类风湿关节炎发病原因，通过抑制免疫反应的起始环节治疗本病的药物。为此，本发明人经过多年研究发现了可以用以治疗类风湿关节炎的非 T 细胞结合肽。研究证明，本申请中的多肽能够抑制 HLA-DR $\beta$ 1 分子以及 T 细胞对抗原的识别和由此而致的自身免疫反应，从类风湿关节炎发病的中心环节遏止本病的发生和发展。

## 二、发明概述

本发明的目的之一是提供能够有效治疗类风湿关节炎的非 T 细胞结合肽。

本发明的另一目的是提供所述非 T 细胞结合肽在治疗类风湿关节炎中的用途。

最后，本发明提供了含有所述非 T 细胞结合肽的药物组合物。

本发明所用术语“非 T 细胞结合肽”指对 SEQ ID NOS: 1-7 多肽中任意一个或多个氨基酸进行修饰后仍能够与 HLA-DR $\beta$ 1 结合的多肽。用于修饰氨基酸的方法是本领域技术人员熟知的。

本发明主要是用丙氨酸 (A) 或甘氨酸 (G) 替换 CII 原形肽中一个或多个可与 T 细胞受体结合，并刺激 T 细胞增殖的氨基酸，保留与 HLA-DR $\beta$ 1 结合的氨基酸，由此形成一类新的仅与 HLA-DR $\beta$ 1 分子结合，而不被 T 细胞受体识别的 CII 多肽分子，即附件中所列的七种非 T 细胞结合肽 (267A、268A、269A、270A、Mut269-270、Mut268-270、Mut267-270)，其序列及名称见序列表。

HLA-DR $\beta$ 1、抗原多肽及 T 细胞受体三分子之间的相互识别和结合是类风湿关节炎异常免疫反应的中心环节。因此，本发明从导致类风湿关节炎的关键点——阻断 T 细胞对抗原的结合入手，利用非 T 细胞结合肽竞争性抑制致病抗原的作用及 T 细胞对抗原的识别，遏止类风湿关节炎患者体内的异常免疫反应，从而控制发病及病变的进展，达到从根本上治疗类风湿关节炎的目的。

已经证明，HLA-DR $\beta$ 1 中的第 70-74 位氨基酸含有一段共同序列 QK/RRAA (即 Gln-Lys/Arg-Arg-Ala-Ala，谷氨酰胺-赖氨酸/精氨酸-精氨酸-丙氨酸-丙氨酸)<sup>(1)</sup>，该段共同序列与 HLA-DR $\beta$ 1 抗原结合槽的形成有关，是其结合抗原的功能氨基酸。本发明人和 Wucherfennig 等的大量研究证明该序列中带正电荷的第 71 位氨基酸 (Lys 或 Arg) 是抗原结合的关键部位<sup>(2-8)</sup>。

通过 X 线衍射技术对 HLA-DR $\beta$ 1 - 抗原二聚体结晶结构的研究发现, 与类风湿关节炎相关的 HLA-DR $\beta$ 1 (DR4/DR1) 分子相结合的多种抗原肽在构型上均极其相似, 其中包括变性 II 型胶原(CII)及热休克蛋白等<sup>(9-12)</sup>。从这些肽的立体结构(图 1)可见, Phe<sub>263</sub> (P1)、Glu<sub>266</sub> (P4) 和 Gly<sub>271</sub> (P9) 的侧链伸向左侧的 HLA-DR $\beta$ 1 分子, 全部或部分嵌入抗原结合槽内。而其它氨基酸的侧链则伸向一侧或与 HLA-DR $\beta$ 1 相反的 (T 细胞受体) 方向, 刺激 T 细胞活化。由图 2 可见 CII 多肽的 P1、P4、P9 侧链嵌入 HLA-DR $\beta$ 1 结合抗原的“口袋”中。带负电荷的 P4 (Glu) 与 HLA-DR $\beta$ 1 上带正电荷的第 71 位氨基酸 (Lys<sub>71</sub>) 相邻, 形成高亲和力的极性结合。因此, Glu<sub>266</sub> 可能是 CII 多肽结合 DR $\beta$ 1 的关键氨基酸<sup>(13,14)</sup>。之后的研究进一步证明, CII 主要靠 Gln<sub>267</sub>、Gly<sub>268</sub>、Pro<sub>269</sub> 和 Lys<sub>270</sub> 与 T 细胞受体结合, 导致 T 细胞激活<sup>(12-14)</sup>。由此可见, CII 多肽中主要与 HLA-DR $\beta$ 1 结合的氨基酸为 Phe<sub>263</sub>, Gly<sub>265</sub>, Glu<sub>266</sub> 及 Gly<sub>271</sub>、Glu<sub>272</sub>, 而主要与 T 细胞受体结合的氨基酸为 Gln<sub>267</sub>, Gly<sub>268</sub>, Pro<sub>269</sub>, Lys<sub>270</sub> (表 1)。

表 1. CII 中与 T 细胞受体 (TCR) 和 HLA-DR $\beta$ 1 结合

DR $\beta$ 1		DR $\beta$ 1						DR $\beta$ 1	
↑		↑						↑	
F	K	G	E	Q	G	P	K	G	E
263	264	265	266	267	268	269	270	271	272
				↓	↓	↓	↓		
				TCR	TCR	TCR	TCR		

\* F=Phe (苯丙氨酸), K=Lys (赖氨酸), G=Gly (甘氨酸), E=Glu (谷氨酸),  
Q=Gln (谷氨酰胺), P=Pro (脯氨酸), R=Arg (精氨酸), A=Ala (丙氨酸)

基于以上的研究基础, 本发明人将 CII 肽中与 T 细胞受体结合、刺激 T 细胞激活的氨基酸用丙氨酸 (A) 或甘氨酸 (G) 替换, 保留与 HLA-DR $\beta$ 1 结合的氨基酸, 形成一种仅与 DR $\beta$ 1 分子结合, 而不被 T 细胞受体识别的非 T 细胞结合肽。这种非 T 细胞结合多肽可特异

性结合 HLA-DR $\beta$ 1, 竞争性抑制自身抗原与 HLA-DR $\beta$ 1 的结合。从而抑制由 HLA-DR $\beta$ 1 介导的自身免疫反应及由此引起的炎症介质释放等病理过程。

因此, 在本发明的实施方案中, 提供了非 T 细胞结合肽及其类似物, 优选 F K G E A G P K G E (SEQ ID NO: 1)、F K G E Q A P K G E (SEQ ID NO: 2)、F K G E Q G A K G E (SEQ ID NO: 3)、F K G E Q G P A G E (SEQ ID NO: 4)、F K G E Q G A A G E (SEQ ID NO: 5)、F K G E Q A G A G E (SEQ ID NO: 6) 及 F K G E G A G A G E (SEQ ID NO: 7) 多肽。这些多肽可以与类风湿关节炎发病相关的 HLA-DR $\beta$ 1 的特异序列 QK/RRAA (即 Gln-Lys/Arg-Arg-Ala-Ala) 结合, 从而使 T 细胞的激活受到抑制, 达到治疗类风湿关节炎及其它 T 细胞介导的自身免疫病的目的。

在本发明的实施方案中还提供了含所述非 T 细胞结合肽或其类似物与可药用载体或佐剂的组合物。

这些可药用载体或佐剂包括乳糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇、马铃薯淀粉、玉米淀粉或支链淀粉、纤维素衍生物、明胶、硬脂酸镁及硬脂酸钙等。可将所述组合物制成片剂、丸剂、胶囊剂、糖浆剂、粉剂、粒剂或溶液剂等。例如将所述药物组合用于口服给药时, 该活性化合物可以与上述可药用载体或佐剂混合, 然后压制成片剂。如果需要亦可包衣。

液体制剂还可以包括本领域技术人员熟知的其它赋形剂。该药物组合物中还可能包含药剂学允许的一些载体, 如水、混悬剂和乳化剂等其它成分。

在本发明组合物中, 非 T 细胞结合多肽或其类似物的含量通常为 50-200 $\mu$ g/片, 最佳为 100 $\mu$ g/片。本领域技术人员根据患者的疾病情况、体重、年龄等可具体确定所施用的本发明非 T 细胞结合多肽的量。

本发明的非 T 细胞结合肽或其类似物可以通过多种途径 (例如:

口服、注射等)对关节炎患者给药。

#### 附图说明

图 1. 已发表的与 HLA-DR $\beta$ 1 结合的五肽(CII, HSP70, Clip, HA, HB) 三维结构的相似性。5 个多肽分别标以不同颜色重叠在一起, 左右两个图从不同角度显示这些肽的结构。由图可见这些多肽的结构极其相似。左侧的第 1 (P1), 4 (P2), 9 (P9) 位氨基酸侧链与 HLA-DR $\beta$ 1 结合, 全部或部分嵌入抗原结合槽内。而其它氨基酸的侧链多伸向一侧或与 HLA-DR $\beta$ 1 相反的 TCR 方向、刺激 T 细胞的活化 (Immunity 7: 473-81, 1997)。

图 2. CII 多肽与 HLA-DR $\beta$ 1 结合的晶体结构。CII 多肽的 P1、P4 和 P9 的侧链嵌入 HLA-DR $\beta$ 1 的抗原结合“口袋”中。P4 (Glu, 带负电荷) 与 HLA-DR $\beta$ 1 上的 Lys<sub>71</sub> (带正电荷) 形成高亲和力的极性结合点 (Immunity 7: 473-81, 1997)。

图 3. 非 T 细胞结合肽与 CII 原型多肽在 T 细胞激活作用的比较。与 CII 原形肽相比, Mut267-270, Mut268-270, Mut269-270, 269A 及 270A 多肽均无明显 T 细胞激活作用。

图 4. 非 T 细胞结合肽对 T 细胞激活的抑制作用。将非 T 细胞结合肽及原形肽与 T 细胞激活系统共同孵育时, 非 T 细胞结合肽可明显抑制原形 DR $\beta$ 1 结合肽的 T 细胞激活作用, 而且, 这种抑制作用随非 T 细胞结合肽浓度的增加而增强。

图 5. CIA 关节炎模型的滑膜病理特点。HE 染色可见滑膜增厚和淋巴细胞浸润, 部分关节可见血管翳形成; 病理变化与关节肿胀率呈正相关。

图 6. 非 T 细胞结合肽(267A) 对胶原性关节炎 (CIA) 的治疗作用。3 个治疗组第 8、10、12、14 日的右足肿胀率和关节炎评分均显著低于对照组 ( $p < 0.05$  或  $0.01$ ); 治疗后第 8 天和第 16 天, 对照组 CIA 缓解率显著低于 3 个治疗组 ( $p < 0.05$ )。

图 7. 非 T 细胞结合肽(267A) 对胶原性关节炎 (CIA)  $\text{TNF}\alpha$  产生的抑制作用。100 $\mu\text{g}$  /ml 剂量组外周血  $\text{TNF}\alpha$  浓度显著低于对照组 ( $p < 0.05$ ); 其他两个治疗组与对照组相比无显著性差异。

以下通过实施例进一步说明本发明, 但下列实施例不以任何方式限制本发明的范围。

## 实施例

### 实施例 1: 多肽的设计及合成

前述的研究工作<sup>(4, 5, 9-11)</sup>已经证明, CII 多肽中 267-270 位氨基酸主要与 T 细胞受体结合, 并激活 T 细胞。本发明的试验中首先利用 Flechsler 等<sup>(14)</sup>报道的固相法合成了一组七条含单一或数个氨基酸 (CII267-270) 替换的非 T 细胞结合肽 (表 2)。为提高这些多肽的吸收率、利用度及增强疗效, 合成中将每条肽的氨基端与十四烷酸基因相连, 以利多肽向细胞内转运。本研究中所用十肽均含有 4 个以上亲水残基, 如赖氨酸 (K) 及谷氨酸 (E), 易于溶解和吸收。这些肽不含易降解的甲硫氨酸 (M)、色氨酸 (W)、或易脱氨、脱羧基的天门冬氨酸 (N) 等。因此, 肽的稳定性好, 并且易于进入细胞内发挥其干扰 T 细胞识别的作用。

表 2. 非 T 细胞结合肽的设计

氨基酸位置	26	26	26	26	26	26	26	27	27	27
多肽名称	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2
CII WTM	F	K	G	E	Q	G	P	K	G	E
267A	—	—	—	—	A	—	—	—	—	—
268A	—	—	—	—	—	A	—	—	—	—
269A	—	—	—	—	—	—	A	—	—	—
270A	—	—	—	—	—	—	—	A	—	—
Mut269-270	—	—	—	—	—	—	A	A	—	—
Mut 268-270	—	—	—	—	—	A	G	A	—	—
Mut 267-270	—	—	—	—	G	A	G	A	—	—

研究表明, 上述 7 条非 T 细胞结合肽中与 T 细胞结合的氨基酸 (267-270) 分别由丙氨酸 (A) 或/和甘氨酸 (G) 替换, 均具有抑制 T 细胞激活的作用, 其中 267A 及 Mut267-270 多肽的显著效果已

通过细胞系试验及关节炎动物模型证明(见后述)。

实施例 2: 本发明非 T 细胞结合肽对 T 细胞激活的抑制作用

抗原多肽通过抗原呈递细胞表达并激活 T 细胞, 引起体内炎性介质的产生, 进而引起关节炎的特征性病理变化。在实验中, 通过测定 T 细胞增殖及白细胞介素 (IL)-2 水平检测非 T 细胞结合肽对 T 细胞激活的抑制作用, 本研究中采用以下两套国际上认可的抗原呈递及 T 细胞激活系统:

---

抗原提呈细胞: L57.23 细胞: 识别 HLA-DR1 抗原 (DR1 转基因)

Priess 细胞: 识别 HLA-DR1/4 (EBV 转染)

T 细胞: 3.19 细胞: HLA-DR1 特异性 T 细胞株

3838 细胞: HLA-DR4 特异性 T 细胞株

---

其中 L57.23 细胞与 3.19 细胞为一套抗原提呈及 T 细胞激活系统, Priess 细胞和 3838 细胞为另一套系统。通过比较上述七种非 T 细胞结合肽对抗原提呈及 T 细胞激活作用影响的差异, 筛选出对 T 细胞激活有明显抑制作用的非 T 细胞结合肽。

在反应体系中首先加入抗原呈递细胞和不同的非 T 细胞结合肽 (10 $\mu$ g/ml) 及相应的 T 细胞, 37 $^{\circ}$ C 培养 48 小时, 取其上清, 加入生长状态良好的 IL-2 依赖细胞 (CTLL) 中, 应用四唑盐法 (MTT) 检测 CTLL 细胞增殖情况, 从而了解非 T 细胞结合肽对 T 细胞激活的抑制效应。

本研究的结果显示, 原型 DR $\beta$ 1 结合肽在 400、200、80、40、20 $\mu$ g/ml 的浓度下均可刺激 T 细胞的增殖, 上清中可检测到较高的 IL-2 浓度, 而 7 条非 T 细胞结合肽对 T 细胞激活的刺激作用明显较弱, 其上清中 IL-2 浓度显著低于原形肽 ( $p < 0.01$ ) (图 3)。将非 T 细胞结合肽

与原形肽及 T 细胞激活系统共同孵育时, 非 T 细胞结合肽可明显抑制原形 DR $\beta$ 1 结合肽的 T 细胞激活作用, 而且, 这种抑制作用随非 T 细胞结合肽浓度的增加而增强 (图 4)。进一步的试验证明, 应用替换第 267 位氨基酸的非 T 细胞结合多肽治疗胶原诱导的关节炎大鼠, 可以显著减轻关节肿胀和炎性反应。以上结果显示, 原型 CII263-272 多肽含有 II 型胶原的抗原表位, 替换该多肽中与 T 细胞结合的氨基酸, 然后形成的非 T 细胞结合多肽可阻断 T 细胞受体对该多肽的识别, 并可抑制 T 细胞的激活。这一系列的结果均提示非 T 细胞结合肽有可能成为干扰 HLA-DR1/DR4 介导的自身免疫反应的新方法。

### 实施例 3: 本发明非 T 细胞结合肽对实验性关节炎的抑制作用

在导致关节炎的免疫反应中, 抗原呈递细胞是通过抗原诱导 T 细胞激活, 并促使 T 细胞的增殖, 引起动物体内的细胞因子 (例如 TNF $\alpha$ 、IL-1) 水平增高, 进而导致类风湿关节炎的特征性病理变化。所以, 通过检测实验动物体内的细胞因子的水平可了解非 T 细胞结合肽对关节炎的抑制作用。同时, 通过病理切片也能从组织学的角度对药物疗效作出全面的评判。

在本发明的动物实验方案中, 以牛 CII 诱导 Wistar 大鼠的胶原性关节炎 (CIA), 然后用本发明中非 T 细胞结合肽对关节炎大鼠进行治疗, 发现 267A 多肽可明显抑制大鼠关节炎, 使关节肿胀程度减轻, 病程缩短 (见结果部分)。

#### (1) 实验性关节炎动物模型的建立:

本发明中的实验性关节炎模型采用了国际公认的胶原性关节炎 (CIA)<sup>(13,14)</sup>。实验动物为封闭群美国 Wistar 大鼠, 本系大鼠为 1907 年由美国 Wistar 研究所培育而成, 是我国引进最早, 使用最广泛的品种之一。本实验用大鼠均在北京大学人民医院动物实验中心 (洁净程度 II 级) 饲养, 大鼠被关闭在垫有木刨花的聚苯乙烯笼中, 保

持 12 小时白天/黑夜循环,使之可自由饮水和摄取食物。用于试验的大鼠均为 8-10 周龄的雄性大鼠,体重  $180 \pm 10\text{g}$ 。实验中涉及动物的全部程序均按我国实验动物管理条例进行。

从 Sigma 公司购得牛 II 型胶原(批号: C1188),用无水冰醋酸溶解配成  $8\text{mg/ml}$  的溶液,再用等体积的完全福氏佐剂(Difco,底特律,美国)乳化,在每只 Wistar 大鼠的右足底部注射  $100\mu\text{l}$  乳化物,注射剂量为  $400\mu\text{l}/\text{只}$ 。本实验成功建立了 Wistar 大鼠的关节炎模型。

#### (2) 对关节炎的评估:

在用 CII 诱导了 Wistar 大鼠的关节炎后约 15 天,全部大鼠均出现跖趾和趾间关节肿胀。用 0-16 的记分等级评估关节炎,对四只脚爪的每只按 0-4 记分,其中 0=没有关节肿胀,1= 1 个关节肿胀,2= 2 个关节肿胀,3= 3 个关节肿胀,4= 全部关节肿胀,即整个脚爪肿胀。总的得分数由四只脚爪分别评分后累计得到。从免疫后 2 天开始,每天对大鼠进行一次检查,直至试验完成。

#### (3) 非 T 细胞结合肽对 Wistar 大鼠的关节炎的治疗:

于 Wistar 大鼠出现关节炎的第 4-7 天,将出现关节炎的大鼠随机分为 4 组,其中 3 个治疗组,1 个对照组,每组 10 只,每隔 3 天于大鼠尾根部皮下注射非 T 细胞结合肽 267A,注射前用灭菌蒸馏水溶解,3 个试验组使用的浓度分别为  $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $500\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $1000\mu\text{g}/\text{ml}$ ,每只大鼠各  $100\mu\text{l}$ ,对照组注射溶媒。每天用排水法测量右足体积变化,并用前述的关节炎评估方法对发生关节炎的关节数目作关节炎评分。治疗 18 天后处死动物,留取外周血,用  $\text{TNF}\alpha$  和 IL-2 ELISA 试剂盒(晶美生物技术公司,深圳)检测其血清中的相应细胞因子的浓度;同时,取右足关节,固定,脱钙,切片做 HE 染色。

#### (4) 应用 SPSS 软件包做统计分析。

(5) 结果: 本发明非 T 细胞结合肽对实验性关节炎的抑制作用用牛 II 型胶原对 40 只雄性 Wistar 大鼠进行关节炎的诱导,结

果全部大鼠于第 14 天至第 17 天时均出现不同程度的跖趾和趾间关节肿胀。在出现关节炎的第 4-7 天, 将大鼠随机的分为 4 组, 其中 1 个为对照组, 其它 3 个为治疗组, 每组 10 只。3 个试验组使用的多肽 267A 的浓度分别为 100 $\mu$ g/ml、500 $\mu$ g/ml、1000 $\mu$ g/ml, 并用前述的关节炎评估方法对发生关节炎的关节数目评分。

结果显示, 治疗前各组间右足肿胀率关节炎评分及外周血 IL-2 浓度无显著差异。所有出现肿胀的踝关节和跖趾关节的 HE 染色可见不同程度滑膜增厚和淋巴细胞浸润, 部分关节可见血管翳形成(图 5), 病理变化与关节肿胀呈正相关。3 个治疗组于治疗后的 2 周内大鼠右足肿胀逐渐减轻, 而对照组的右足肿胀无明显变化。

经过本发明非 T 细胞结合肽 267A 对关节炎大鼠进行治疗, 用药后第 4 天三个治疗组大鼠的关节炎均开始明显减轻(图 6, 见下列表 3)。3 个治疗组关节炎的缓解率显著高于对照组 ( $p < 0.05$ ), 第 8、10、12、14 日的右足肿胀率和关节炎评分均显著低于对照组 ( $p < 0.01$ ); 3 个治疗组间无显著性差异。100 $\mu$ g /ml 剂量组外周血 TNF $\alpha$ 浓度显著低于对照组 ( $p < 0.05$ ) (图 7)。这些结果证明, 非 T 细胞结合肽可减轻关节炎大鼠的自身免疫性炎症, 抑制胶原性关节炎的程度及病程, 该多肽可能对类风湿关节炎有治疗作用。

表 3. 各组大鼠治疗右后足肿胀情况变化

	编 号	踝 关 节	第 一 趾	第 二 趾	第 三 趾	第 四 趾	第 五 趾	后足 体积 (ml)	肿胀 关节 数	平 均 数
对照组	1	+	+	+	+	+	+	1.5	6	6.2
	2	-	+	++	++	++	-	1.4	7	
	3	+	++	++	+	++	-	1.5	8	
	5	+	-	++	+	+	+	1.3	6	
	6	+	-	+	+	+	++	1.4	6	
	7	+	-	+	++	+	+	1.3	6	
	8	+	++	-	+	+	+	1.5	6	
	9	+	+	+	+	+	+	1.4	7	
	10	+	+	+	-	+	-	1.2	4	
10mg 组	1	+	-	-	+	-	-	1.2	2	3.15 *
	2	-	+	+	-	+	+	1.5	4	
	3	+	+	-	-	-	+	1.4	3	
	4	-	-	-	-	+	++	1.3	3	
	5	+	-	+	-	-	++	1.3	4	
	6	+	-	+	-	-	-	1.3	2	
	7	-	+	-	-	-	-	1.1	1	
	8	+	+	++	-	+	+	1.3	6	
	9	+	-	-	-	-	-	1.3	1	
	10	+	++	+	-	-	-	1.2	4	
50mg 组	1	+	+	+	-	+	-	1.4	4	3.25 *
	2	+	+	-	++	+	+	1.4	6	
	3	+	+	+	-	+	-	1.4	4	
	4	-	+	-	+	++	++	1.7	6	
	5	+	-	-	-	+	-	1.3	2	
	6	+	-	-	-	-	-	1.4	1	
	7	+	-	-	-	-	-	1.1	1	
	8	-	-	+	-	-	-	1.6	1	
	9	+	+	-	-	-	+	1.6	3	
	10	-	-	-	+	+	+	1.4	3	

\* 与对照组相比, 肿胀关节数明显减少 ( $P < 0.01$ )

本发明人对其它本申请中非 T 细胞结合肽 268A, 269A, 270A, Mut267-270 及 Mut267-270 进行了上述 T 细胞激活和/或 CIA 模型的实验研究, 均取得了与 267A 多肽类似的结果。

## 参考文献

1. Gregersen P.K, et.al: Arthritis Rheum 30:1205-1213, 1987.
2. Wucherpfennig KW et.al: J Exp Med. 181:1597-1600, 1995.
3. 栗占国等: 中国免疫学杂志 2002,18: 76-78.
4. Li ZG et.al: J Clin Invest (submitted) 2001.
5. Li ZG et.al: Chin Med J 2002.
6. 栗占国等: 中华内科杂志 2001, 40: 19-21.
7. 栗占国等: 中华医学杂志 2001, 81: 111-113.
8. 栗占国等: 中华风湿病杂志 2001, 5: 145-147.
9. Stern LJ, et al: Nature 368:215-221, 1994.
10. Fremont DH, et al: Science 272:1001-1004, 1996.
11. Jardetzky TS, et al: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 734-738, 1996.
12. Dessen A, et al: Immunity 7:473-81, 1997.
13. Rosloniec EF, et al: J Exp Med. 185:1113-1122, 1997.
14. Anderson EC, et al: Proc. Natl. Acad. USA 95: 7574-79, 1998.
15. Flechsler I, et al: J Pept Sci 1(3):141-200, 1995.

## 权利要求

1、 与具有共同序列 QK/RRAA(即 Gln-Lys/Arg-Arg-Ala-Ala)的靶序列结合的非 T 细胞结合肽及其类似物。

2、 选自下列任一序列的非 T 细胞结合肽:

F K G E A G P K G E (SEQ ID NO: 1)

F K G E Q A P K G E (SEQ ID NO: 2)

F K G E Q G A K G E (SEQ ID NO: 3)

F K G E Q G P A G E (SEQ ID NO: 4)

F K G E Q G A A G E (SEQ ID NO: 5)

F K G E Q A G A G E (SEQ ID NO: 6)

F K G E G A G A G E (SEQ ID NO: 7)。

3、 含有权利要求 1 的非 T 细胞结合肽及其类似物及可药用载体或佐剂的药物组合物。

4、 权利要求 1 的非 T 细胞结合肽及其类似物在制备治疗类风湿关节炎的药物中的应用。

5、 权利要求 1 的非 T 细胞结合肽及其类似物在治疗类风湿关节炎中的用途。

6、 将权利要求 1 的非 T 细胞结合肽及其类似物施用给类风湿关节炎患者。

7、 含有权利要求 2 的非 T 细胞结合肽及可药用载体或佐剂的药物组合物。

8、 权利要求 2 的非 T 细胞结合肽在制备治疗类风湿关节炎的药物中的应用。

9、 权利要求 2 的非 T 细胞结合肽在治疗类风湿关节炎中的用途。

10、将权利要求 2 的非 T 细胞结合肽施用给类风湿关节炎患者。

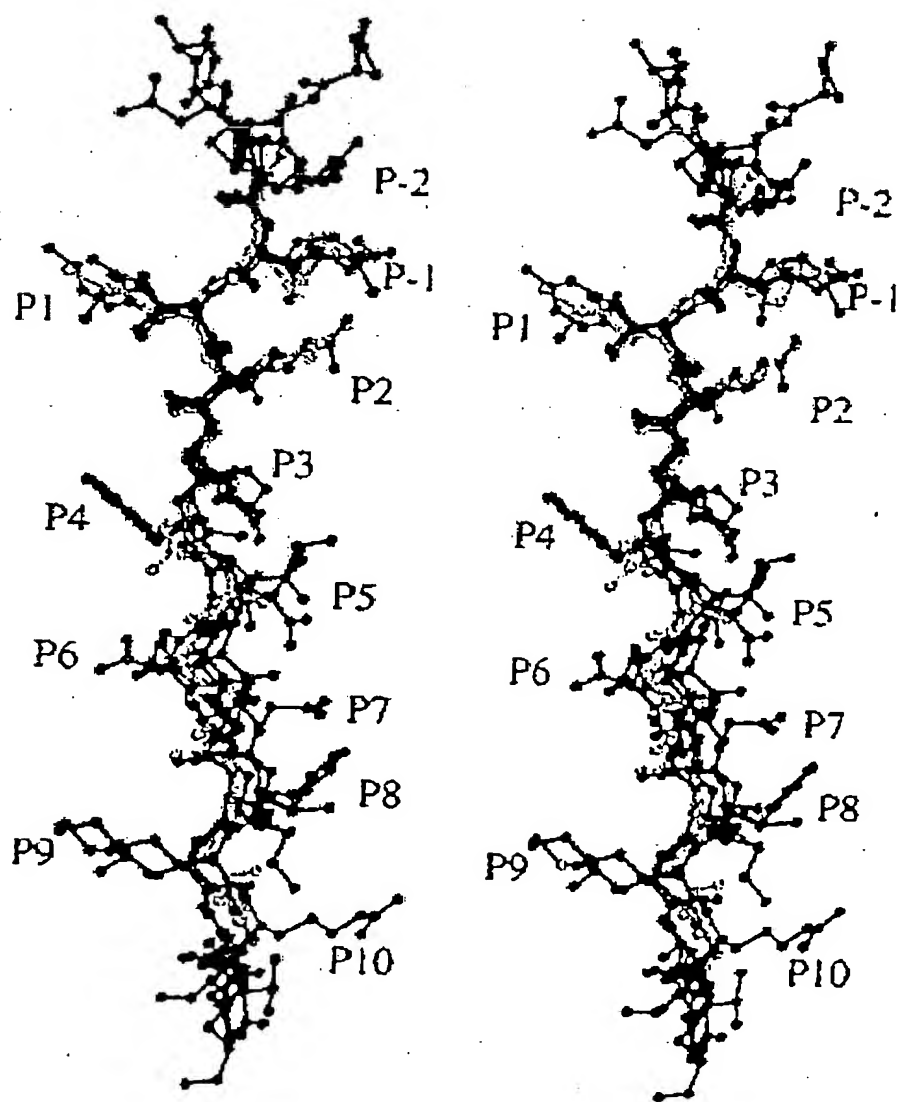


图 1. 已发表的与 HLA-DR $\beta$ 1 结合的五肽 (CII, HSP70, CIIp, HA, HB) 三维结构的相似性。

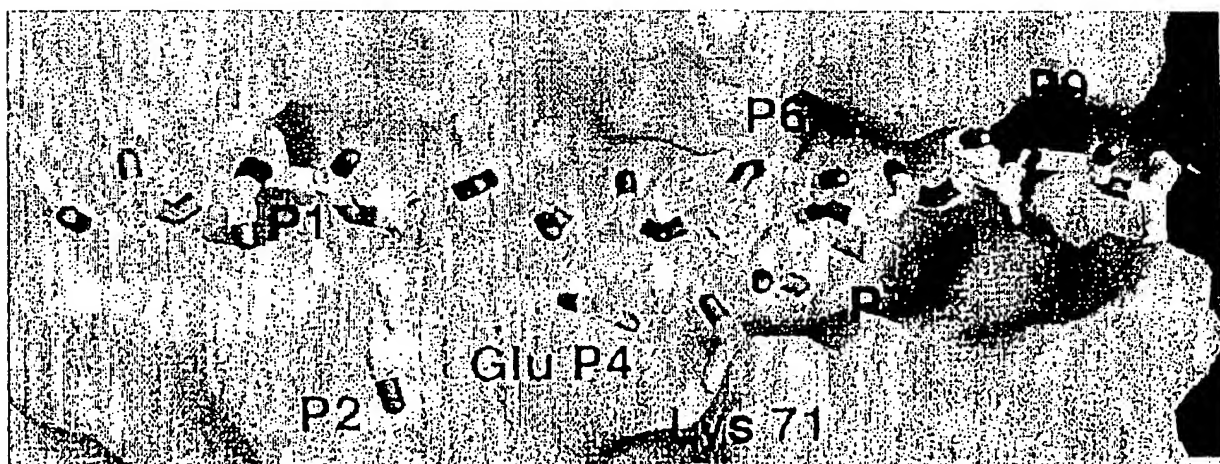


图 2. CII 多肽与 HLA-DR $\beta$ 1 结合的晶体结构

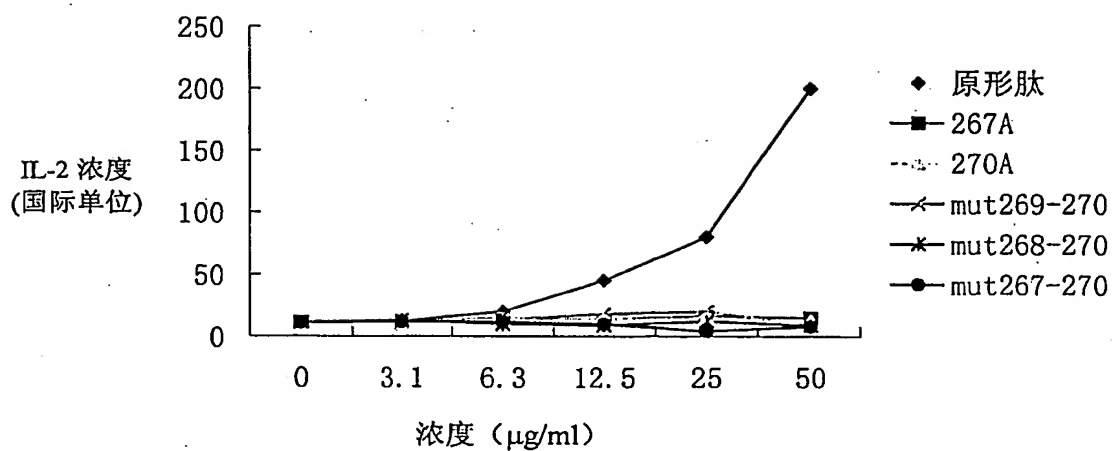


图 3. 非 T 细胞结合肽与 CII 原型多肽在 T 细胞激活作用的比较

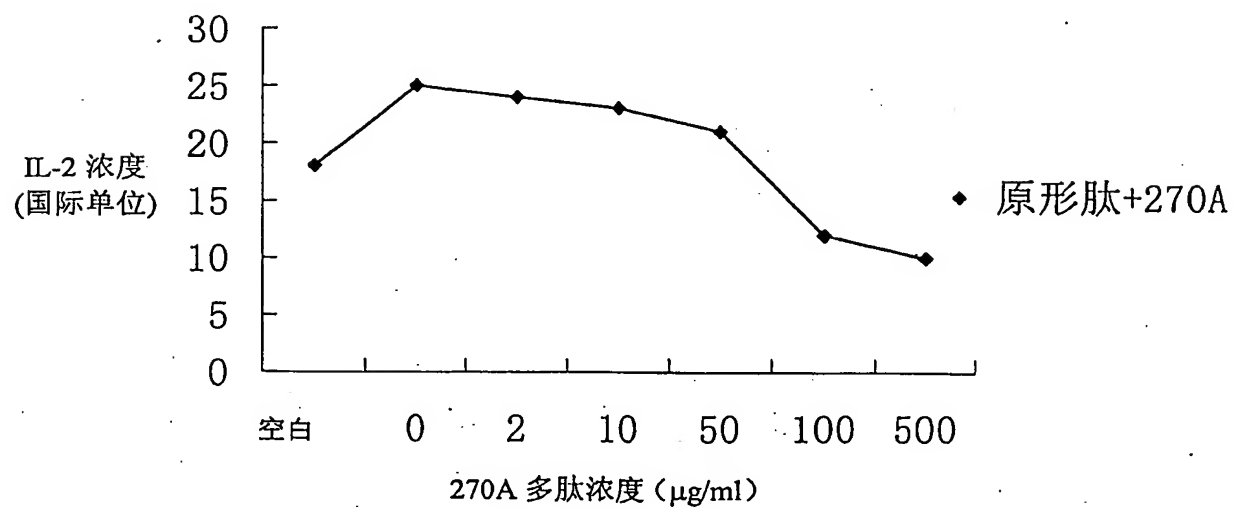


图 4. 非 T 细胞结合肽对 T 细胞激活的抑制作用



图 5. CIA 关节炎模型的滑膜病理特点

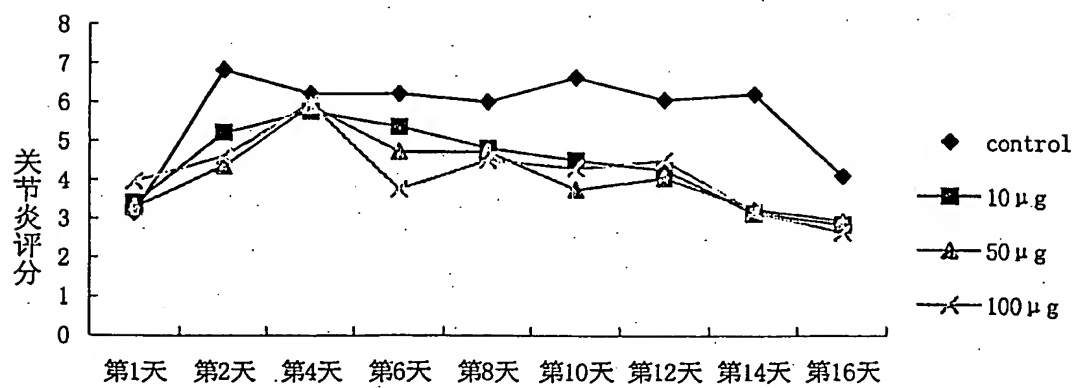


图 6. 非 T 细胞结合肽 (267A) 对胶原性关节炎 (CIA) 的治疗作用

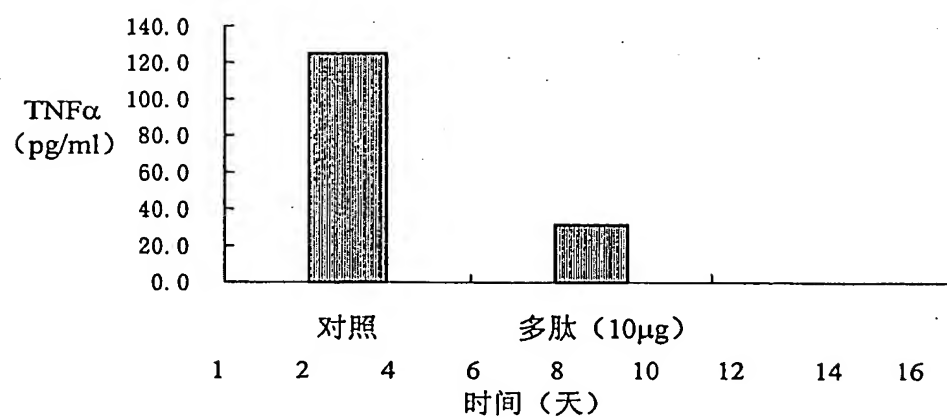


图 7. 非 T 细胞结合肽(267A) 对胶原性关节炎 (CIA) TNFα产生的抑制作用

## 序列表

<110> 北京大学人民医院

<120> 非 T 细胞结合肽及其用途

<130>

<140> PF030044

<141> 2002-06-22

<160> 7

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 1

Phe Lys Gly Glu Ala Gly Pro Lys Gly Glu  
1 5 10

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 2

Phe Lys Gly Glu Gln Ala Pro Lys Gly Glu  
1 5 10

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 3

Phe Lys Gly Glu Gln Gly Ala Lys Gly Glu  
1 5 10

<210> 4  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成

<400> 4  
Phe Lys Gly Glu Gln Gly Pro Ala Gly Glu  
1 5 10

<210> 5  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成

<400> 5  
Phe Lys Gly Glu Gln Gly Ala Ala Gly Glu  
1 5 10

<210> 6  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成

<400> 6  
Phe Lys Gly Glu Gln Ala Gly Ala Gly Glu  
1 5 10

<210> 7  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 7

Phe Lys Gly Glu Gly Ala Gly Ala Gly Glu  
1 5 10

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/CN03/00496

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC<sup>7</sup> : C07K7/06,A61K38/08,A61P19/02,A61P37/06

According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched(classification system followed by classification symbols)

IPC<sup>7</sup> : C07K7/06,A61K38/08,A61P19/02,A61P37/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the field searched

Electronic data base consulted during the international search(name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI,EPODOC,PAJ,CNPAT

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant claim No.
A	US2002037844 A1, KANG AH,et al, A61K38/00; 2002/03/28 See the abstract.	1-4,7-8
A	WO9833811 A1, ASTRAZENECA AB,et al; C07K7/06; 1998/08/06 See the abstract.	1-4,7-8
A	WO9641644 A1, NIPPON MEAT PACKERS INC,et al, A61K38/39,1996/12/27 See the abstract.	1-4,7-8
A	CN1183784 A,HOECHST PHARM&CHEM KK, C07K7/06,1998/06/03 See the abstract.	1-4,7-8
A	CN1310724 A,AKZO NOBEL NV, C07K14/47, 2001/08/29 See the abstract.	1-4,7-8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☒ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason(as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

03 August 2003 (03.08.03)

Date of mailing of the international search report

14 AUG 2003 (14.08.03)

Name and mailing address of the ISA/

The Chinese Patent Office  
6, Xitucheng Road, Haidian District,  
Beijing, 100088, China

Facsimile No. 86-010-62019451

Authorized officer

ZENG,Fanhui

Telephone No. 62093733



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/CN03/00496

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos: 5, 6, 9, 10  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
methods for the treatment of disease
2. ☐ Claims Nos:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/CN03/00496

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members	Publication date
US2002037844 A1	2002/03/28	US6423315 B1	2002/07/23
WO9833811 A1	1998/08/06	AU200231421 A	2002/05/30
		CN1246125 A	2000/03/01
		EP1007547 A1	2000/06/14
		BR9811250 A	2000/09/26
		JP2001511143 T	2001/08/07
		AU744907 B	2002/03/07
WO9641644 A1	1996/12/27	EP0834321B1	2003/05/02
		JP9059176 A	1997/03/04
		US6010722 A	2000/01/04
CN1183784 A	1998/06/03	WO9631529 A1	1996/10/10
		AU5162296 A	1996/10/23
		JP8333390 A	1996/12/17
		EP0821003 A1	1998/01/28
		US6034064 A	2000/03/07
CN1310724 A	2001/08/29	AU758310 B	2003/03/20
		WO0005254 A2	2000/02/03
		BR9912378 A	2001/04/17
		EP1100823 A2	2001/05/23
		JP2002521388 T	2002/07/16

## 国际检索报告

国际申请号,  
PCT/CN03/00496

## A. 主题的分类

Int.Cl<sup>7</sup>: C07K7/06,A61K38/08,A61P19/02,A61P37/06

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

## B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号)

Int.Cl<sup>7</sup>: C07K7/06,A61K38/08,A61P19/02,A61P37/06

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词)

WPI,EPODOC,PAJ,CNPAT

## C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 包括相关段落的说明	相关的权利要求编号
A	US2002037844 A1, KANG AH 等, A61K38/00; 2002/03/28 见摘要	1-4,7-8
A	WO9833811 A1, ASTRAZENECA AB 等; C07K7/06; 1998/08/06 见摘要	1-4,7-8
A	WO9641644 A1, NIPPON MEAT PACKERS INC 等, A61K38/39,1996/12/27 见摘要	1-4,7-8
A	CN1183784 A,赫彻斯特药品和化学品公司, C07K7/06,1998/06/03 见摘要	1-4,7-8
A	CN1310724 A,阿克佐诺贝尔公司, C07K14/47, 2001/08/29 见摘要	1-4,7-8

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

## \* 引用文件的专用类型:

“A” 明确表示了一般现有技术、不认为是特别相关的文件

“E” 在先文件,但是在国际申请日的同一日或之后公布的

“L”对优先权要求可能产生怀疑或者用来确定另一篇引用文件的公布日期或其它特殊理由而引用的文件(如详细说明)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他手段的文件

“P” 在国际申请日之前但迟于所要求的优先权日公布的文件

“T”在国际申请日或优先权日之后公布的在后文件,它与申请不相抵触,但是引用它是为了理解构成发明基础的理论或原理

“X”特别相关的文件;当该文件被单独使用时,要求保护的发明不能认为是新颖的或不能认为具有创造性

“Y”特别相关的文件;当该文件与其他一篇或多篇这类文件结合在一起,这种结合对本领域技术人员是显而易见的,要求保护的发明不能认为具有创造性

“&amp;” 同族专利成员的文件

国际检索实际完成的日期

03.8月 2003(03.08.03)

国际检索报告邮寄日期

14.8月 2003(14.08.03)

国际检索单位名称和邮寄地址

中国国家知识产权局专利局

中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088)

传真号:

86-010-62019451

授权官员

曾繁辉

电话号码: 010-62093733



国际检索报告

国际申请号

PCT/CN03/00496

第I栏 关于某些权利要求不能作为检索主题的意见(接第1页第1项)

按条约 17(2)(a)对某些权利要求未作国际检索报告的理由如下:

1. ☒ 权利要求(编号): 5,6,9,10

因为它们涉及到不要求本国际检索单位检索的主题, 即:  
疾病的治疗方法

2. ☐ 权利要求(编号):

因为它们涉及到国际申请中不符合规定的要求的部分, 以至于不能进行任何有意义的国际检索,  
具体地说:

3. ☐ 权利要求(编号):

因为它们是从属权利要求, 并且没有按照细则 6.4(a)第 2 句和第 3 句的要求撰写。

第II栏 关于缺乏发明单一性时的意见(接第1页第2项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明, 即:

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了所要求缴纳的全部附加检索费, 本国际检索报告针对全部可作检索的权利要求。

2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求都进行检索, 本国际检索单位未通知缴纳任何附加费。

3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分所要求缴纳的附加检索费, 本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。  
具体地说, 是权利要求(编号):

4. ☐ 申请人未按时缴纳所要求的附加检索费。因此, 本国际检索报告仅涉及权利要求中首先提到的发明;  
包含该发明的权利要求是(编号):

关于异议的说明: ☐ 申请人的异议书随附加检索费同时提交。

☐ 支付附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告  
同族专利成员的情报

国际申请号  
PCT/CN03/00496

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利成员	公布日期
US2002037844 A1	2002/03/28	US6423315 B1	2002/07/23
WO9833811 A1	1998/08/06	AU200231421 A	2002/05/30
		CN1246125 A	2000/03/01
		EP1007547 A1	2000/06/14
		BR9811250 A	2000/09/26
		JP2001511143 T	2001/08/07
		AU744907 B	2002/03/07
WO9641644 A1	1996/12/27	EP0834321B1	2003/05/02
		JP9059176 A	1997/03/04
		US6010722 A	2000/01/04
CN1183784 A	1998/06/03	WO9631529 A1	1996/10/10
		AU5162296 A	1996/10/23
		JP8333390 A	1996/12/17
		EP0821003 A1	1998/01/28
		US6034064 A	2000/03/07
CN1310724 A	2001/08/29	AU758310 B	2003/03/20
		WO0005254 A2	2000/02/03
		BR9912378 A	2001/04/17
		EP1100823 A2	2001/05/23
		JP2002521388 T	2002/07/16

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**